

To Be Mailed

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭61-17

⑬ Int.Cl.⁴
A 61 K 31/725
// C 08 B 37/00

識別記号
ADU

庁内整理番号
6664-4C
7133-4C

⑭ 公開 昭和61年(1986)1月6日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全13頁)

⑮ 発明の名称 ムコ多糖系癌転移抑制剤

⑯ 特 願 昭59-118283

⑰ 出 願 昭59(1984)6月11日

⑱ 発 明 者 桜 井 勝 清 東大和市立野3丁目1253番地 生化学工業株式会社東京研究所内

⑲ 発 明 者 堀 江 克 之 東大和市立野3丁目1253番地 生化学工業株式会社東京研究所内

⑳ 発 明 者 坂 本 崇 東大和市立野3丁目1253番地 生化学工業株式会社東京研究所内

㉑ 発 明 者 奥 山 隆 東大和市立野3丁目1253番地 生化学工業株式会社東京研究所内

㉒ 出 願 人 生化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目9番地8

㉓ 代 理 人 弁理士 津 国 肇 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

ムコ多糖系癌転移抑制剤

2. 特許請求の範囲

ヒアルロン酸若しくは架橋ヒアルロン酸又はその塩を有効成分とすることを特徴とするムコ多糖系癌転移抑制剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、ムコ多糖系癌転移抑制剤に関する。

癌の治療には、主として外科療法・放射線療法及び化学療法が試みられているが、癌の再発及び延命効果の点で満足すべき治療効果を挙げていない。

この原因の一つは、これらの治療法で癌の原発巣を縮小又は除去し得ても、癌が原発巣とは別の部位、特に脳、肺又は肝臓などの主要臓器に転移増殖し、致命的な結果を招くからである。従って、癌原発巣の縮小を計るか、癌を外科的に切除する療法に加えて、癌の転移を防止することが癌の根治を計る上で極めて重要である。

腫瘍細胞の転移は、(a)発生部位における急速な細胞増殖、(b)血管内への侵入、(c)特定臓器の毛細血管内への沈着、(d)血管の内側から外側への透過、(e)転移部位での急速な増殖など多くの過程から成っている。原理的には、この中のどれか一つの過程を抑制すれば転移が抑制される筈である。(c)から(e)までの過程、即ち、血管壁の内側への沈着とそれにつづく外側への透過、そして増殖は、一定数の腫瘍細胞を直接マウスの静脈へ注射し、時間を追ってそれら細胞の挙動と、標的となる臓器に新生する転移コロニーの数を組織学的、生化学的に定量する手法があり、多くの例が報告されている。

例えば、Rozら [A. Rat, et al.; Cancer Research, 40, 1845-1851(1980)]は、マウスメラノーマ(悪性黒色細胞腫)細胞50,000個をC57BL/6マウスの静脈に注射し、18日後に肺を切除して転移によって生じたメラノーマ細胞の黒色コロニーの数をカウントした場合、そのコロニー数の平均値はメラノーマ細胞の細胞表面化学組成

と密接な関係があることを報告している。

また、上述したように腫瘍細胞が転移するためには、その細胞が血管内皮に沈着する過程が不可欠であるが、この沈着は腫瘍細胞の表面に分布する分子と血管内皮マトリックスを構成する分子との相互認識、結合によってひきおこされることが多くの基礎実験によって明らかにされている [R. H. Kramer, et al.; Proceedings of Natural Academy of Science, U.S.A., 76, 5704-5708 (1979)]。

一方、Honmaら [Y. Honma, et al.; Gann, 72, 898-905 (1981)] は、FM3A細胞に転移能が高いほど宿主マウスの生存日数が短くなることを証明している。更に、Kimataら [K. Kimata, et al.; Cancer Research, 43, 1347-1354 (1983)] は、FM3A細胞の転移能が高いほど細胞表面にヒアルロン酸（以下「HA」という）を多量にもつことを報告している。一般的に、HAは細胞の膜表面のHA受容体や細胞表面及び生体内の各種組織・器官に存在するフィブロネクチンやコラーゲ

ンに親和性を示すことが明らかにされている。

ば、これが血管内皮のHA受容体や表面にでているフィブロネクチンに結合し、癌細胞が血管内皮へ沈着することを防止し、また一度沈着した癌細胞と拮抗的に競合して、その癌細胞を内皮より遊離させると共に、HAの有する免疫増強作用で癌細胞を抑制できるのではないかと想定し、鋭意研究を行なった結果、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明のムコ多糖系癌転移抑制剤は、HA若しくは架橋HA又はその塩を有効成分とするものである。

以下、本発明を更に詳細に説明する。

本発明に用いるHAは、肩帯、鶏冠、種子体など特にその由来は限定されず、通常、分子量数千から数百万のものを用いる。その精製法としては、特開昭52-145584号、同52-105188号、同54-87100号及び同55-74788号公報記載の方法などが挙げられる。

本発明において、架橋HAとは、HA又はその塩を多官能性エポキシ化合物で架橋させて成る架

橋HAであって、架橋数がHAのグルクロン酸と

また、HAはある濃度でマクロファージの食作用を阻害することや [E. A. Balazs; Immunology, 40, 435-448 (1980)]、逆に非常に薄い濃度では *in vitro* 及び *in vivo* でマクロファージや多核白血球 (PMN) の運動量、代謝速度、食作用を増加させることも知られている [L. Häkansson, et al.; Scand. J. Immunol., 11, 849-853 (1980)]。

しかしながら、HAの癌転移抑制剤としての適用に関する報告は未だなされていない。

また、多硫酸化多糖体が制癌効果や癌転移抑制作用を有することが報告 [Eiro Tsubura et al.; Gann, 87, 849-858 (1978); Keiichi Sueyasu et al.; Gann, 82, 331-336 (1971); 安西重義; 日医大誌, 第47巻第5号, 487-504 (1980)] されているが、これは多硫酸化多糖体の有する抗血液凝固作用や繊維素溶解作用によるところが大きく、HAはこれらの作用は殆どもっていない。

そこで、本発明者らは、動物にHAを投与すれ

橋HAであって、架橋数がHAのグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンから成る繰り返し二糖（以下「HAの繰り返し二糖」という）1000個当り5以上であるものであり、特開昭58-88440号明細書に詳述されている。

本発明において、多官能性エポキシ化合物とは、エポキシ基を少なくとも1個有する化合物であって、その他に、エポキシ基を含めて、HAを架橋するに適した官能基を1個以上有する化合物をいう。

かかる化合物としては、例えば、ハロメチルオキシラン化合物及びビスエポキシ化合物などが挙げられる。ハロメチルオキシラン化合物としては、エピクロルヒドリン、エピブロムヒドリン、β-メチルエピクロルヒドリン及びβ-メチルエピブロムヒドリンなどが挙げられる。ビスエポキシ化合物としては、1,2-ビス(2,3-エポキシプロポキシ)エタン、1,4-ビス(2,3-エポキシプロポキシ)ブタン、1,6-ビス(2,3-エポキシプロポキシ)ヘキサン及びビ

スフェノール A 又はビスフェノール F のジグリシジルエーテルなどが挙げられる。

H A 又は架橋 H A の塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩及びカルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩等が挙げられる。

架橋 H A は、ヒアルロニダーゼ抵抗性を有するものであり、次のようにして合成することができる。

通常、分子量数千から数百万の H A 又はその塩を、0.5% 以上、好ましくは 1.0% 以上の濃度に、アルカリ水溶液に溶解し、水溶性有機溶剤を全液量の 30% 以上、好ましくは 50% 以上になるように加える。アルカリ水溶液は、pH 8~14 であることが好ましく、pH 12~14 であることが更に好ましい。アルカリとしては、通常、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウムなどの金属水酸化物及び炭酸ナトリウム、炭酸カリウムなどの金属炭酸塩等が挙げられる。水溶性有機溶剤としては、メタノール、エタノール、イソプロパ

ノール、アセトン、ジオキサンなどが挙げられ、これらは、単独で又は混合物として用いられる。これらの水溶性有機溶剤を加えることにより反応を有効に行なうことができ、また、アルカリによる H A の分解（低分子化）も抑制することができる。

次いで、得られた溶液に、前記多官能性エポキシ化合物の 1 種以上を加え、0~100℃、好ましくは 10~80℃、更に好ましくは 20~40℃ で反応させる。反応時間は、反応温度により異なるが、20℃ 近辺では 24 時間から 48 時間が好ましく、40℃ 近辺では 2 時間から 3 時間が好ましい。

本反応において、H A 又はその塩と多官能性エポキシ化合物とのモル比を変えることにより、得られる架橋 H A 又はその塩の架橋率を調節することができる。

本発明で用いる架橋数が H A の繰り返し二糖 1000 個当り 5 以上である架橋 H A を得るには、H A の繰り返し二糖 1 モルに対し、多官能性エポキシ化合物 1 モル以上用いればよい。分子量 100

万前後の H A においては、H A の繰り返し二糖 1 モルに対する多官能性エポキシ化合物の使用モル数を 1~10 モルにすれば、水溶性で糸糸性を有する架橋 H A（以下「s-架橋 H A」という）を得ることができ、該使用モル数を 10 モル以上にすれば、水不溶性でゲル状の架橋 H A（以下「I-s-架橋 H A」という）を得ることができる。また、分子量 200 万前後の H A においては、それぞれ、2~8 モル、6 モル以上で同様の目的を達成できる。

s-架橋 H A は、高粘性、即ち、H A に比し粘度が高く、1% 生理食塩水溶液における粘度（20℃、ずり速度 1.0 sec^{-1} ）は、通常、850~50000 センチポアーズであり、非ニュートン指数（近藤仁、北里医学、10, 485(1980)）は 0.5~0.8 である。

架橋 H A 及びその塩は、ヒアルロニダーゼに対して抵抗性を示すと共に、H A の有する種々の特性も維持している。

特に、s-架橋 H A は、水溶性であり、また、

高粘性であるにもかかわらず、無理なく注射針を通過することから、本発明に用いるのに好ましいものである。

また、本発明の癌転移抑制剤に用いる H A としては、極限粘度が 0.2~30 であるもの、即ち、分子量が 4000~2000000 であるものが好ましい。

本発明の癌転移抑制剤の適用に際しては、顆粒剤、細粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、シロップ剤、懸濁剤若しくは液剤等の剤型にして、又は原末のまま経口投与してもよいし、注射剤として静脈内投与、動脈内投与、門脈内投与、胸腹腔内投与、筋肉内投与、皮下投与又は腫瘍内投与してもよい。また、坐剤等の剤型にして、経腸又は非経口投与してもよい。経口、経腸若しくは非経口投与に適した医薬用の有機又は無機の、固体又は液体の担体若しくは希釈剤を本発明の癌転移抑制剤の調製に用いることができる。水、ゼラチン、乳糖、でんぷん、ステアリン酸マグネシウム、タルク、動植物油脂、ベンジルアルコール、ガム、ポリアルキレングリコール、石油樹脂、やし油、ラ

ノリン又は医薬に用いられる他のキャリアー（担体）はすべて、本発明に用いるHAの担体として適用することができる。また、安定剤、湿潤剤、乳化剤や、浸透圧を変えたり、配合剤の適切なpHを維持するための塩類を補助薬剤として適宜用いることもできる。

臨床投与量は、HAの分子量によって異なるが、通常、経口投与により用いる場合には、成人に対しHA又は架橋HAとして、1日25mg～5g内服するのが好ましく、年齢、病態、症状により適宜増減することが更に好ましい。前記1日量の癌転移抑制剤は、1日に1回、又は適当な間隔をおいて1日に2若しくは3回に分けて投与してもよいし、間欠投与してもよい。

また、注射剤として用いる場合には、成人に対しHA又は架橋HAとして、1回量10mg～2.5gを連続投与又は間欠投与することが好ましい。

本発明の癌転移抑制剤は、一般の制癌剤、例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤等にみられる骨髄障害、心毒性、脱毛等の副作用が全くなく、鎮痛

作用や炎症による組織の破壊をすみやかに修復する作用を併有している。更に、本発明の癌転移抑制剤と共に適切に投与することができる他の医薬として有効な成分、例えば、一般の抗悪性腫瘍剤又は抗炎症剤、抗生物質、止血剤若しくは消化性潰瘍治療剤等と殆ど相互作用をもたないという長所を有する。

本発明の癌転移抑制剤は、その薬理からみて、特にプロテオグリカンを活発に合成し、細胞表面に保有している種々の悪性腫瘍の転移抑制に用いられるが、特に、高転移性の悪性腫瘍、例えば、悪性黒色腫（メラノーマ）、線維肉腫（フィブロザルコーマ）、リンパ肉腫（リンフォザルコーマ）、リンパ腫（リンフォーマ）等に対して優れた効果が期待され、また外科療法時には転移が起きやすいので、このような場合にも、優れた効果を示すと推定される。

以下に、本発明を調製例、試験例及び実施例に基づいて更に詳細に説明するが、これらは、本発明の範囲を何ら制限するものではない。

なお、以下の調製例等において、極限粘度、ウロン酸（グルクロン酸）含量、窒素含量、蛋白含量の測定並びに抗原性試験、発熱性物質試験、細菌試験は、それぞれ、「日局10」一般試験法第28項粘度測定法、Z. Dische; J. Biol. Chem., 187, 189(1947)、「日局10」一般試験法第25項窒素定量法、O.H.Lowry, et al.; J. Biol. Chem., 193, 265(1951)、「日局10」デキストラン40注射液、「日局10」一般試験法第30項発熱性物質試験法、衛生試験法注解【日本薬学会編】(1980年) 1.4 微生物試験法記載の方法に従って行なった。

調製例1. HAの抽出・精製

鶏頭から切り離した後、直ちに凍結した鶏冠1.0kgを解凍し、0.08%塩化セチルピリジニウム溶液3ℓを加え、95℃に3時間保った後、鶏冠を分取、ミンチし、水3ℓを加え、プロリシン（上田化学工業調製；プロテアーゼの商品名）20万単位を加え50℃に5時間保ち、濾過して濾液3400ℓを得た。この濾液3400ℓに塩化ナト

リウム170gを添加、溶解し、次いで95%エタノール3500ℓを加え、生じた沈殿を分取・乾燥してHA6.1gを得た。

更に、このHAを1%の濃度になるように滅菌した生理食塩水に溶解し、一般的な操作、例えば、滅菌濾過を行ないHAの生理食塩水溶液を調製した。

得られたHA粉末及びHA生理食塩水溶液の物性は次の通りであった。

HA粉末（試料 No. HA-1）

極限粘度：28.5

ウロン酸含量：48.4 %

窒素含量：3.48 %

蛋白含量：0.01 %

抗原性：なし

1%生理食塩水溶液

HA濃度：1.00%

発熱性物質：なし

菌数：一般細菌 0個/g

真菌 0個/g

調製例 2. H A の抽出・精製

鶏頭から切り離した後、直ちに凍結した鶏冠10 kgを解凍し、調製例 1 に準じて H A を調製した。得られた H A 粉末及び H A 生理食塩水溶液の物性は次の通りであった。

H A 粉末 収量 62.0 g (試料 No. H A - 2)

極 限 粘 度 : 15.0

ウロン酸含量 : 48.7 %

窒 素 含 量 : 3.46 %

蛋 白 含 量 : 0.018 %

抗 原 性 : なし

1 % 生理食塩水溶液

H A 濃 度 : 0.98 %

発熱性物質 : なし

菌 数 : 一般細菌 0 個 / g

真菌 0 個 / g

調製例 3. H A の調製

試料 No. H A - 2 10 g を 0.1 N 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に 1.0 % に溶解し牛草丸ヒアルロニダーゼ (生化学工業調製) 9 mg を加え、50℃で 1.3 時間

菌 数 : 一般細菌 0 個 / g

真菌 0 個 / g

調製例 4. H A の調製

試料 No. H A - 2 を用いて調製例 3 に準じて以下の表に示す H A を製造した。

表 1

| 試料 No. | H A 粉 末 | | | | | | 1 % 生理食塩水溶液 | | |
|---------|---------|--------|------|-------|-----|--------|-------------|-----|----|
| | 極限粘度 | ウロン酸含量 | 窒素含量 | 蛋白含量 | 抗原性 | H A 濃度 | 発熱性物質 | 菌 数 | 真菌 |
| H A - 4 | 2.5 | 48.50 | 3.44 | 0.009 | - | 1.02 | - | 0 | 0 |
| H A - 5 | 0.8 | 48.40 | 3.52 | 0.012 | - | 1.00 | - | 0 | 0 |
| H A - 6 | 0.4 | 48.70 | 3.48 | 0.010 | - | 1.04 | - | 0 | 0 |

反応した。得られた溶液にエタノールを 1.5 等量加え沈殿物を得て、再度 2 % の H A 濃度になるように精製水に溶解し、1.5 等量のエタノールを加えて沈殿物を得た。沈殿物を 2 % の H A 濃度になるように精製水に溶解し、滅菌活性炭 (121℃で 80 分加熱処理し精製水で洗浄) を加え、滅菌ラジオリイト (121℃で 80 分加熱処理し精製水で洗浄) を用いて処理した。処理にエタノールを加えて沈殿物を得た。

得られた H A 粉末及び H A 生理食塩水溶液の物性は次の通りであった。

H A 粉末 収量 8.7 g (試料 No. H A - 3)

極 限 粘 度 : 7.0

ウロン酸含量 : 48.0 %

窒 素 含 量 : 3.47 %

蛋 白 含 量 : 0.010 %

抗 原 性 : なし

1 % 生理食塩水溶液

H A 濃 度 : 1.02 %

発熱性物質 : なし

調製例 5. HAの調製

試料 No. HA-2 10gを0.1N酢酸緩衝液 (pH 5.0)に1%に溶解し、牛車丸ヒアルロニダーゼ 100mgを加えて50℃で37時間反応した。反応液を減圧下で濃縮し、セファデックス G10のカラムで脱塩し、更にセファデックス G25のカラムで8糖以上と8糖以下とに分画した。8糖以下の画分を更にセファデックス G10で脱塩し、減圧下濃縮後、濾過滅菌して凍結乾燥した。

得られたHA粉末 (試料 No. HA-7) の物性は次の通りであった。

極限粘度: 0.075

ウロン酸含量: 48.28 %

窒素含量: 3.48 %

蛋白質含量: 0.011%

抗原性: なし

薄層クロマトグラフィー: 8糖以下

(メルク社キーゼルゲル80F, 展開溶媒 n-プロパノール-濃アンモニア水 (40:30:2.5), 発色 アニスアルデヒド-硫酸)

(2) s-架橋HAのゲルクロマトグラフィー

(1)で合成されたs-架橋HAと合成に使用したHAについてガラスビーズ CPG 3000 (ELECTRO NUCLEONICS, INC.社) のカラム(8×850mm)を用いて、ゲルクロマトグラフィーを行なった。展開溶媒は1.5N塩化ナトリウム水溶液を水酸化ナトリウムでpH 8.5に調整して使用し、0.52mlずつ溶出画分に分け、カルパゾール-硫酸法でウロン酸を定量した。結果を図1に示す。図1において、○印及び●印は、それぞれ、s-架橋HA及びHAの各フラクションのカルパゾール-硫酸法における吸光度を表わし、V₀はゲル粒子外部容積を表わす。

図1から、s-架橋HAは、HAに比し、非常に高分子になっていることがわかる。

(3) s-架橋HAの非ニュートン指数

(1)で合成されたs-架橋HAと合成に使用したHAとの1%生理食塩水溶液について回転粘度計 (関東京計器製E形粘度計) を用い、ずり速度を変え、37℃で粘度を測定し、非ニュートン指数

調製例 6

(1) s-架橋HAの合成

HAナトリウム塩 (分子量 7.3×10^5) 10gを0.2N水酸化ナトリウム溶液450mlに冷却しつつ溶解し、0.45μのマイクロフィルターで濾過した。濾液に10N水酸化ナトリウム溶液40mlを加えて、攪拌下、エタノール500mlとエピクロルヒドリン6.0mlを加えた。20℃で24時間反応し、反応液を酢酸でpH 6.4に調整した。エタノール500mlを加えて白色沈殿物を得、濾取後、エタノールで十分に洗浄し、減圧乾燥した。

収量 8.9g (試料No. s-架橋HA-1)

HAの繰り返し二糖 8.5
1000個当りの架橋数

1%生理食塩水溶液 11000センチポアーズ
における粘度 (20℃, ずり速度 1.0 sec^{-1})

非ニュートン指数 0.60

元素分析値 C: 42.0%, H: 4.87%,
N: 3.29%, Na: 5.81%

($m = \frac{a}{b}$) を算出した。結果を図2に示す。図2において、○印及び●印は、それぞれ、s-架橋HA及びHAの1%生理食塩水溶液の各ずり速度における粘度を表わす。

(4) s-架橋HAの曳糸性

(1)で合成されたs-架橋HAと合成に使用したHAの曳糸性を、渡辺式曳糸性測定装置 (池内安, 日本整形外科学会雑誌, 34, 175(1980)) を模して作製した装置を用いて測定した。結果を図3に示す。図3において、○印、△印、及び●印は、それぞれ、s-架橋HAの0.5%生理食塩水溶液、同1%生理食塩水溶液及びHAの1%生理食塩水溶液の各引き上げ速度における曳糸性を表わす。

図3から、s-架橋HAは、高い曳糸性を有することがわかる。

(5) s-架橋HAの鎮痛効果

(1)で合成されたs-架橋HAについて、次のようにして、その鎮痛効果を検討した。

ビーグル犬を雌雄の別なく用い、一方の後肢の

ヒザ関節に疼痛物質として、ブラジキニン又はアセチルコリンのそれぞれ20 μ g又は2mgをs-架橋HA 2.5mg/0.5ml生理食塩水と同時に投与し、投与側の後肢荷重の変動を経時的に測定した。また、対照としてs-架橋HAの代りに(1)で原料として用いたHAナトリウム塩5mg/0.5ml生理食塩水を用いた。鎮痛効果は、正常時の50%荷重回復時間をもって比較した。結果を表2に示す。

表 2

| 疼 痛 物 質 | 50%回復時間 |
|----------------|---------|
| ブラジキニン | 8.8分 |
| ブラジキニン+HA-Na | 3.4分 |
| ブラジキニン+s-架橋HA | 4.0分 |
| アセチルコリン | 21 分 |
| アセチルコリン+HA-Na | 11 分 |
| アセチルコリン+s-架橋HA | 11 分 |

表2から、s-架橋HAは、HAナトリウム塩と同様に優れた鎮痛効果を有することがわかる。

調製例7. s-架橋HAの合成

調製例6(1)に準じて後処理を行なった。

また、分子量 1.7×10^5 のHAナトリウム塩75mgを1N水酸化ナトリウム7.5mlに溶かした溶液にエタノール7.5mlとエピクロルヒドリン40 μ l又は80 μ lとを加え、40℃で2時間反応した。更に、上記反応と同時に同じ条件で[2 μ C]エピクロルヒドリン(アマシヤム・ジャパン社から入手)を用いて反応を行ない、この標識化合物の放射活性から架橋率を算出した。架橋率と粘度との関係を表3に示す。

表3から、s-架橋HAにおいては、架橋率と粘度とが比例関係にあることがわかる。

HAカリウム塩(分子量 1.7×10^5)の1%水溶液に10N水酸化カリウム0.1mlとメタノール5mlを加えた。攪拌下、エピブロムヒドリン17mgを加えて、20℃で24時間反応後、反応液を酢酸でpH 8.5としてエタノール10mlを加えて白色沈殿を得た。沈殿を濾取し、減圧乾燥した。

収量 98mg

HAの繰り返し二糖
1000個当りの架橋数 7.5

1%生理食塩水溶液
における粘度 34000センチポアーズ
(20℃, ずり速度 1.0 sec^{-1})

非ニュートン指数 0.85

元素分析値 C : 41.98%, H : 4.78%,
N : 3.30%, K : 9.45%

調製例8. 架橋HAの架橋率

分子量 3.7×10^5 及び 7.3×10^5 のHAナトリウム塩100mgを、それぞれ、1N水酸化ナトリウム5.0mlに溶かした溶液に、エタノール5mlとエピクロルヒドリン、それぞれ、25, 50, 100, 200 μ lとを加え、40℃で2時間反応した。反応後は

3 瓶

| 原料HA (分子量) | エピクロルヒドリン (ml) HA (ml) | 繰り返し二糖1000個 当りの架橋数 | 1.0%生理食塩水溶液での粘度 [20℃, ずり速度 1.0 sec^{-1}] (センチポアーズ) |
|-------------------|---------------------------|-----------------------|---|
| 3.7×10^5 | 0 | 0 | 800 |
| | 1.28 | 8.3 | 830 |
| | 2.56 | 11.8 | 850 |
| | 5.12 | 20.8 | 2080 |
| | 10.2 | - | 15100 ^a |
| 7.3×10^5 | 0 | 0 | 1500 |
| | 1.28 | 5.5 | 1850 |
| | 2.56 | 8.2 | 8240 |
| | 5.12 | 17.8 | 34300 |
| | 10.2 | 18.3 | 50000 ^a |
| 1.7×10^5 | 0 | 0 | 11500 |
| | 2.56 | 5.6 | 20100 |
| | 5.37 | 11.8 | 55400 ^a |

^a これを他と比べるとゲル化(水不溶性)する。

試験例 1. s-架橋 HA のヒアルロニダーゼ抵抗性

分子量 7.3×10^5 の HA ナトリウムを出発原料として調製例 6 (1) に準じて次に示す 3 種の s-架橋 HA を合成した。

| | |
|--|-------|
| (A) HA の繰返し二糖 1000個当りの架橋数 | 13 |
| 1%生理食塩水溶液 における粘度 (20℃, ズリ速度 1.0 sec^{-1}) | 45500 |
| 非ニュートン指数 | 0.77 |
| (B) HA の繰返し二糖 1000個当りの架橋数 | 11.5 |
| 1%生理食塩水溶液 における粘度 (20℃, ズリ速度 1.0 sec^{-1}) | 28000 |
| 非ニュートン指数 | 0.70 |
| (C) HA の繰返し二糖 1000個当りの架橋数 | 7.5 |
| 1%生理食塩水溶液 における粘度 (20℃, ズリ速度 1.0 sec^{-1}) | 8000 |
| 非ニュートン指数 | 0.61 |

これらの 3 種の s-架橋 HA 及び合成に使用した HA ナトリウム塩を、それぞれ、0.1M 酢酸 (pH 5.0) に 1% の濃度に溶解し、測定 (20℃, ズリ速度 1.0 sec^{-1}) したところ、次の通りであった。

| | |
|-------------|---------------|
| s-架橋 HA (A) | 45000 センチポアーズ |
| s-架橋 HA (B) | 27000 センチポアーズ |
| s-架橋 HA (C) | 8000 センチポアーズ |
| HA ナトリウム塩 | 1500 センチポアーズ |

これらの溶液に 0.09 重量% になるように牛率丸ヒアルロニダーゼを加え 50℃ で反応させ、15、35、55、70 分後に粘度を測定し、反応前の粘度に対する割合を算出した。

結果を図 4 に示す。図 4 において、□印、△印、○印及び●印は、それぞれ、s-架橋 HA (A)、(B)、(C) 及び HA ナトリウム塩の酢酸溶液の各反応時間における反応前の粘度に対する割合を表わす。

図 4 から、本発明に用いる s-架橋 HA は、HA に比し、ヒアルロニダーゼに対する抵抗性が高く、その程度は、架橋度が高いほど顕著である

ことがわかる。

試験例 2. 腫瘍細胞の増殖能に及ぼす影響

FM3A/p-15A 細胞 1×10^4 個/皿を含む細胞浮遊液 (イーグル MEM 培地に仔牛血清 10% 含む) 1.5 ml と各種 HA 溶液 0.15 ml を含む培地を混合し、組織培養用シャーレ (テルモ社製ベトレイ 12F) で 5% CO₂ - 95% air、37℃ の条件で培養した。培養開始後、3 日目及び 5 日目の細胞数を測定した。実験は、1 群 4 シャーレとして、対照群には、生理食塩水を培地に添加したものを用いた。

結果を表 4 に示す。

表 4

| 培養開始後 | 実験群 | HA濃度 ($\mu\text{E}/\text{ml}$) | 細胞数 ($\times 10^4$ 個/ ml) | | | | | 平均値±標準偏差 |
|-------|------|-------------------------------------|--------------------------------------|------|------|------|--|--------------|
| | | | 実測値 | | | | | |
| 3日目 | HA-6 | 100 | 7.5 | 14 | 11 | 13 | | 11.4 ± 2.8 |
| | | 1000 | 15 | 9 | 14 | 9 | | 11.7 ± 3.2 |
| | HA-2 | 100 | 10 | 6 | 10 | 12 | | 8.5 ± 2.5 |
| | | 1000 | 9 | 10 | 18 | 10.5 | | 11.9 ± 4.1 |
| 5日目 | 対照群 | | 13 | 12.5 | 10.5 | 11.5 | | 11.9 ± 1.1 |
| | HA-6 | 100 | 15 | 25 | 26 | 31 | | 24.2 ± 8.7 |
| | | 1000 | 26.5 | 24.5 | 28 | 28 | | 25.7 ± 0.9 |
| | HA-2 | 100 | 24 | 28 | 23 | 31 | | 26.5 ± 3.7 |
| | | 1000 | 20 | 21 | 23 | 28 | | 22.5 ± 2.6 |
| | 対照群 | | 26 | 28 | 31.5 | 23 | | 26.8 ± 3.5 |

表4から、HAは細胞の増殖に対して何ら影響を及ぼさないことがわかる。

試験例3. 腫瘍細胞の接着能に及ぼす影響

100mmフアルコン社培養皿(100mm Falcon tissue culture dish)で培養したFN3A/p-15A細胞をダルベッコリン酸緩衝液(Dulbecco Phosphate Balanced Solution; Ca, Mg-free)(以下「PBS(-)」という)で洗浄し、ハンクス緩衝液(Hanks Balanced Salt Solution; Ca, Mg-free)にトリプシン0.1%及びエチレンジアミン四酢酸0.04%を溶解した溶液(以下「TE」という)で37℃において5分処理した。同量の培養液【イーグル MEM 培地(Eagle's Minimum Essential Medium)に10%になるように牛胎児血清を加えた溶液】を加え、1200rpmで5分遠心し、同培養液で 5×10^5 個細胞/mlに調整した(A処理細胞)。

一方、100mmフアルコン社ペトリ皿(100mm Petri dish)で培養したFN3A/p-15A細胞を1200rpmで5分遠心し、前記培養液で 5×10^5 個細胞/mlに調整した(B処理細胞)。

A処理細胞とB処理細胞を1mlずつタイプIのコラーゲン(以下「CoI」という)、フィブロネクチン(以下「FN」という)又はラミニン(以下「LN」という)で被覆した35mmの培養皿に入れ、 1×10^6 細胞/培養皿に調整した。各種HAを1mg/mlになるように加え、37℃で20時間培養後、PBS(-)で洗浄し、TEで37℃において15分処理して細胞数を測定した。結果を表5に示す。

表5

| HA 基質 | HA-2 極限粘度15.0 分子量84万 | HA-6 極限粘度0.4 分子量8000 | HA-7 極限粘度0.075 分子量1500 | 対 照 |
|----------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|-----|
| CoI | 103 | 91 | 93 | 84 |
| FN | 99 | 53 | 65 | 81 |
| LN | 7 | 2 | 68 | 75 |

表5から、本発明の癌転移抑制剤は、特にLNに対する腫瘍細胞の接着能を著しく低下させ、その効果は、極限粘度0.075(分子量1500)のHA-7に比し、極限粘度15.0(分子量84万)のHA-

2及び極限粘度0.4(分子量8000)のHA-6の方が顕著であることがわかる。

試験例4. 急性毒性試験

(1) マウスにおけるHA-2投与後の経時的死亡数とLD₅₀値を表6に示す。

表6

| 子 鼠 収 容 数 | 性 別 | 投与量 (mg/kg) | 動物数 | 死 亡 数 (投与後日数) | | | | 死亡総数 | LD ₅₀ 値 (mg/kg) |
|-----------------------|--------|----------------|-----|------------------|-----|-----|-------|------|-------------------------------|
| | | | | 1~3 | 4~6 | 7~9 | 10~14 | | |
| 口 腔 | 雄 | 2400 | 10 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2400 |
| | | 2400 | 10 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | |
| 下 皮 | 雄 | 4000 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4000 |
| | | 4000 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 腹 腔 内 | 雄 | 729 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2000 |
| | | 1020 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | 1429 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | 2000 | 10 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | |
| 腹 腔 内 | 雄 | 729 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2000 |
| | | 1020 | 10 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 | |
| | | 1429 | 10 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | |
| | | 2000 | 10 | 0 | 5 | 1 | 0 | 6 | |

(2) ラットにおけるH A - 2 投与後の経時的死亡数とLD₅₀値を表7に示す。

表 7

| 投与経路 | 性別 | 投与量 (mg/kg) | 動物数 | 死 亡 数 (投与後日数) | | | | | LD ₅₀ 値 (mg/kg) |
|------|----|----------------|-----|------------------|-----|-----|-------|-------|-------------------------------|
| | | | | 1~3 | 4~6 | 7~9 | 10~14 | 15~21 | |
| 経口 | 雄 | 800 | 10 | 0 | 0 | 0 | — | — | > 800 |
| | 雌 | 800 | 10 | 0 | 0 | 0 | — | — | > 800 |
| 皮下 | 雄 | 4000 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | > 4000 |
| | 雌 | 4000 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | > 4000 |
| 腹腔内 | 雄 | 729 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 1020 | 10 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| | | 1429 | 10 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| | 雌 | 2000 | 10 | 0 | 1 | 3 | 2 | 0 | 8 |
| | | 729 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 1020 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 雌 | 1429 | 10 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| | | 2000 | 10 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 4 |

() : 95% 信頼限界

(3) ウサギにおけるH A - 2 の経時的死亡数とLD₅₀値を表8に示す。

表 8

| 投与経路 | 性別 | 投与量 (mg/kg) | 動物数 | 死 亡 数 (投与後日数) | | | | | LD ₅₀ 値 (mg/kg) |
|------|----|----------------|-----|------------------|-----|-----|-------|-------|-------------------------------|
| | | | | 1~3 | 4~6 | 7~9 | 10~14 | 15~28 | |
| 経口 | 雄 | 1000 | 5 | 0 | 0 | 0 | — | — | > 1000 |
| | 雌 | 1000 | 5 | 0 | 0 | 0 | — | — | > 1000 |
| 皮下 | 雄 | 2000 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | > 2000 |
| | 雌 | 2000 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | > 2000 |
| 腹腔内 | 雄 | 889 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 1333 | 5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | | 2000 | 5 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | 雌 | 889 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 1333 | 5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | | 2000 | 5 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 3 |

() : 95% 信頼限界

(4) マウスにおけるHA-6投与後の経時的死亡数とLD₅₀値を表9に示す。

表 9

| 投与経路 | 性別 | 投与量 (mg/kg) | 動物数 | 死 亡 数 (投与後日数) | | | | | 死亡総数 | LD ₅₀ 値 (mg/kg) |
|------|----|----------------|-----|------------------|-----|-----|-------|---|------|-------------------------------|
| | | | | 1~3 | 4~6 | 7~9 | 10~14 | | | |
| 腹腔内 | 雄 | 2000 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | >4000 |
| | | 4000 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 雌 | 2000 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | >4000 |
| | | 4000 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

実施例 HA及びs-架橋HAの癌転移抑制効果

各種極限粘度の異なるHA又はs-架橋HAの生理食塩水溶液をマウスC3H/Heに腹腔内投与し、30分後マウス乳癌由来の高転移能癌細胞FN3A/p-15A 7.5×10^5 個をマウス尾静脈より注入した。

注入3時間後に1回目のHA又はs-架橋HA生理食塩水溶液の腹腔内投与を行ない、それを含めて1日2回計4日間HA又はs-架橋HA生理食塩水溶液を腹腔内投与した。

癌細胞投与21日後にマウスを殺し、肺を摘出して癌の転移巣を計数した。

なお、対照群には、HA又はs-架橋HAの代わりに生理食塩水のみを投与した。結果を表10に示す。

表 10

| 実験群 | 極限粘度 | 投与量 (mg/マウス/day) | 動物数 | 肺に転移した癌の転移巣の数 | |
|----------|-------|---------------------|-----|---------------|------------|
| | | | | 平均値 | 対照群に対する百分率 |
| HA-7 | 0.075 | 20 | 20 | 78.5 | 85.8 |
| | | 40 | 20 | 74.6 | 93.2 |
| HA-6 | 0.4 | 10 | 10 | 23.1 | 28.8 |
| | | 20 | 10 | 24.8 | 30.8 |
| HA-5 | 0.8 | 10 | 10 | 28.8 | 37.3 |
| | | 20 | 10 | 18.3 | 24.1 |
| HA-4 | 2.5 | 0.01 | 10 | 28.3 | 36.6 |
| | | 0.10 | 10 | 13.9 | 17.4 |
| | | 1.00 | 10 | 10.4 | 13.0 |
| HA-3 | 7.0 | 0.25 | 10 | 13.8 | 17.3 |
| HA-2 | 15.0 | 0.25 | 20 | 2.2 | 2.8 |
| | | 0.50 | 10 | 8.4 | 11.8 |
| HA-1 | 28.5 | 0.25 | 10 | 2.8 | 3.5 |
| s-架橋HA-1 | 18.0 | 0.25 | 10 | 4.2 | 5.3 |
| 対 照 群 | | | 40 | 80.0 | 100 |

表10から、本発明の癌転移抑制剤は優れた癌転移抑制効果を有することがわかる。

4. 図面の簡単な説明

図1は、s-架橋HAとHAとのゲルクロマトグラムを示す図である。図2は、s-架橋HA及びHAの粘度測定結果を示す図である。図3は、s-架橋HA及びHAの曳糸性測定結果を示す図である。図4は、各種s-架橋HA及びHAをヒアルロニダーゼ処理したときの粘度低下と時間との関係を示す図である。

図 1

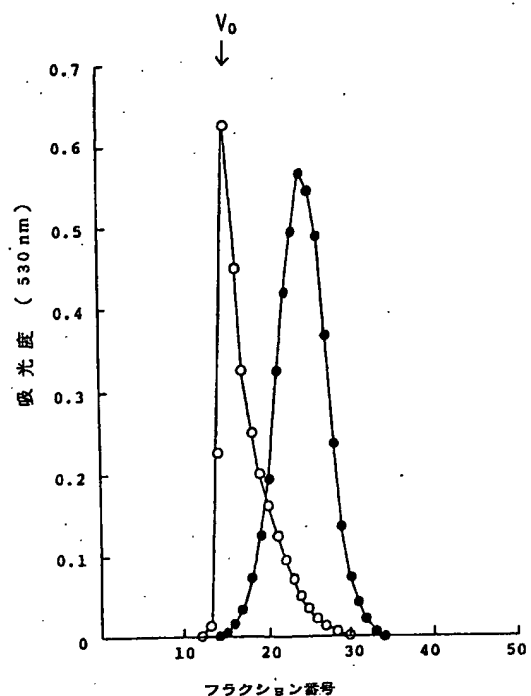


図 2

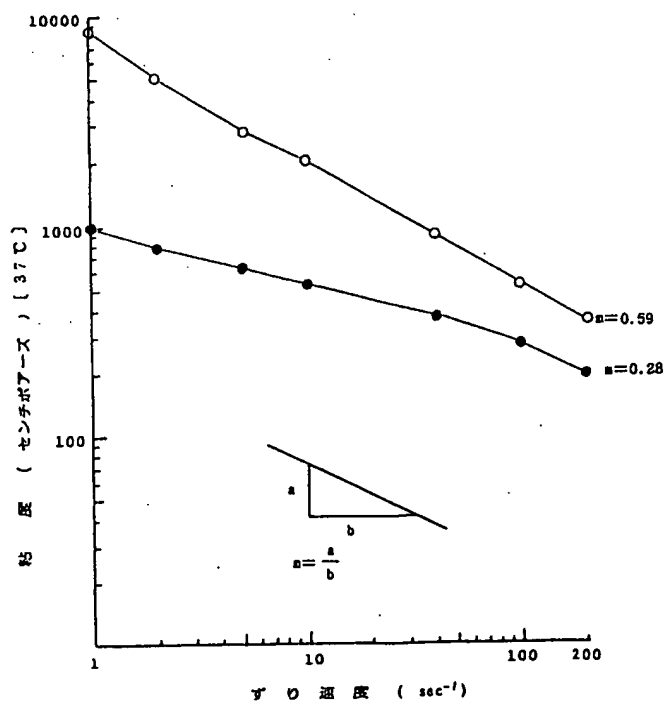


図 3

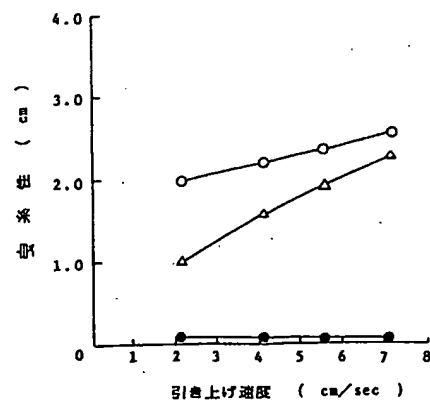


図 4

